



Evaluación del número de células viables de *Bradyrhizobium yuanmingense* Rc-455-02 inoculado sobre semillas de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. y *Vigna radiata* R. Wilczek

*Evaluación del número de células viables de *Bradyrhizobium yuanmingense* Rc-455-02 inoculado sobre semillas de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. y *Vigna radiata* R. Wilczek.*

Renzo A. Valdez-Nuñez^{1*} , Silvia G. Guarniz-Polo¹, Willington Atencia-Rojas¹, Anderson, R. Calixto-García¹

¹ Universidad Nacional de Barranca, Facultad de Ingeniería, Laboratorio de Investigación en Biotecnología Lima, Perú

RESUMEN

Caupí (*Vigna unguiculata*) y loctao (*Vigna radiata*) son leguminosas de grano agroexportables en Perú que realizan fijación biológica de nitrógeno (FBN) asociándose con rizobios del suelo. Para incrementar su capacidad de FBN se emplean inoculantes formulados con rizobios seleccionados. El objetivo del presente estudio fue investigar el número de rizobios viables en la superficie de semillas de caupí y loctao, al tratarse con seis concentraciones de inoculante líquido (25, 30, 35, 40, 45, 50 mL por kg de semilla) conteniendo *Bradyrhizobium yuanmingense* RC-455-02. El recuento celular fue superior en semillas de caupí ($\text{Log}_{10} = 6.79$) y en semillas de loctao ($\text{Log}_{10} = 5.95$), expresado como células rizobiales por semilla, empleando concentraciones de 50 y 30 mL por kg de semilla, respectivamente. Se recomienda emplear 30 mL de inoculante por kg de semilla como concentración óptima para obtener un número adecuado de rizobios y asegurar una óptima nodulación.

Palabras clave: Inoculante líquido; Concentración; Rizobios por semilla; Caupí; Loctao.

ABSTRACT

Cowpea (*Vigna unguiculata*) and loctao (*Vigna radiata*) are grain legumes that are agro-exportable in Peru and that perform biological nitrogen fixation (BNF) by associating with soil rhizobia. Inoculants formulated with selected rhizobia are used to increase their BNF capacity. The objective of this study was to investigate the number of viable rhizobia on the surface of cowpea and loctao seeds, when treated with six concentrations of liquid inoculant (25, 30, 35, 40, 45, 50 mL kg per seed) containing *Bradyrhizobium yuanmingense* RC-455-02. The cell count was higher in cowpea seeds ($\text{Log}_{10} = 6.79$) and in loctao seeds ($\text{Log}_{10} = 5.95$), expressed as rhizobial cells per seed, using concentration of 50 and 30 mL kg per seed, respectively. A concentration of 30 mL of inoculant per kg to seed is recommended as the optimal concentration to obtain an adequate number of rhizobia and ensure adequate nodulation.

Keywords: Liquid inoculant; Concentration; Rhizobia per seed; Cowpea; Loctao.

Cómo citar / Citation: Valdez-Nuñez, R. A., Guarniz-Polo, S. G., Atencia-Rojas, W. y Calixto-García, A. R. (2024). Evaluación del número de células viables de *Bradyrhizobium yuanmingense* Rc-455-02 inoculado sobre semillas de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. y *Vigna radiata* R. Wilczek. QuantUNAB, 3(1), e82. <https://doi.org/10.52807/qunab.v3i1.82>

1. INTRODUCCIÓN

Las leguminosas de grano constituyen parte crucial de la dieta de la población y juegan roles importantes en la sustentabilidad del planeta. Estas se consideran parte de una dieta saludable, debido a su contenido en aminoácidos esenciales, fibra y carbohidratos con baja carga glucémica (Alianza Leguminosas para la salud, 2021). En la sostenibilidad agrícola, las leguminosas son importantes debido a su capacidad de fijar nitrógeno y como sumideros de fijación de carbono, fomentando así una agricultura de baja huella de carbono (Valdez-Nuñez et al. 2022; Stagnari et al. 2017). De manera complementaria, la inclusión de leguminosas en los ciclos agrícolas, inducen cambios positivos en las comunidades microbianas involucradas en el ciclaje de nutrientes y descomposición de la materia orgánica (Yan et al. 2023).

El caupí, *Vigna unguiculata* (L.) Walp., y el loctao, *Vigna radiata* R. Wilczek., son leguminosas de grano originarias de África e India, respectivamente (Pratap y Gupta, 2021). En el Perú, están naturalizadas y presentan una creciente demanda en el sector agroexportador, con valores aproximados por 8 y 20 millones de dólares para caupí y loctao (2023), respectivamente (PromPeru, 2024). Este potencial agroexportador no es sostenible en el tiempo, debido a la falta de tecnologías, tales como semilla de buena calidad, pero sobre todo por la ausencia de paquetes tecnológicos y transferencia tecnológica para la sustitución parcial de agroquímicos, tales como fertilizantes y pesticidas que originan residuos no permisibles (Atkinson, 2023).

Como la mayoría de leguminosas, caupí y loctao se asocian simbióticamente con bacterias del suelo denominadas rizobios (Pratap y Gupta, 2021), los cuales forman nódulos radiculares donde se lleva a cabo el proceso de fijación de nitrógeno. Este proceso simbiótico aporta los aminoácidos requeridos para la síntesis de proteínas presentes en el grano, a cambio, la planta leguminosa brinda sacarosa para completar el proceso (Peix et al. 2015; Masson-Boivin y Sachs, 2018). La capacidad fijadora de nitrógeno para caupí es variable, reportándose hasta 71 kg N ha⁻¹ (Mogale et al. 2023), y para loctao, hasta 90 kg N ha⁻¹ (Sharma et al. 2003). Esta efectividad es afectada por diversos factores bióticos y abióticos, siendo uno de los más importantes, la presencia y la cantidad de rizobios efectivos en el suelo.

El tipo y el número de rizobios presentes en un suelo constituye uno de los factores importantes que afecta la efectividad de la fijación de nitrógeno en las leguminosas (O'Hara et al. 2016). Los procesos de degradación y malas prácticas agrícolas, incluyendo el uso de monocultivos, reducen las poblaciones de rizobios efectivos en los suelos (Verma et al. 2022), por ello se hace necesario la aplicación frecuente de cepas de rizobios efectivos que aseguren la FBN, estos insumos se denominan inoculantes.

Los inoculantes son bioinsumos que presentan una o más bacterias benéficas seleccionadas por su capacidad beneficiosa con uno o varios cultivos específicos, estas se encuentran dispuestas en un soporte orgánico o inorgánico (Santos et al. 2019; Singh y Kumar et al. 2024). Los inoculantes deben presentar una concentración superior a 10⁹ UFC mL⁻¹ o g⁻¹, para inoculantes líquidos o sólidos, respectivamente (Santos et al. 2019), por lo menos al momento de su empleo en la inoculación de semillas. Si la inoculación es exitosa, la cepa de

rizobio podrá colonizar adecuadamente la rizósfera y competir por sitios de infección en la raíz leguminosa con los rizobios nativos presentes en el suelo (Deaker et al. 2016).

Uno de los factores críticos para el éxito de la inoculación es la concentración de bacterias viables al momento de la inoculación en relación al tamaño de la superficie de las semillas inoculadas (Deaker et al. 2016). El número de rizobios adecuado y en cantidad suficiente aseguran la infectividad rápida de la cepa en estudio para su posterior colonización, sobre todo a nivel de raíz principal. Además, un número elevado de células viables por semilla, incrementa la oportunidad de infección y posterior formación de nódulos activos, desde las primeras horas reduciendo la bacterivoria, por organismos como *Bdellovibrio* y *Lysobacter*, protozoarios, entre otros (Martins et al. 2022). Este estudio, es importante debido a la relevancia, de emplear insumos biológicos (inoculantes), y sobre todo relacionado al control de calidad de inoculantes, por ello, el objetivo del presente estudio fue investigar la concentración de rizobios viables en semillas de caupí y loctao al ser inoculadas con seis concentraciones (25, 30, 35, 40, 45 y 50 mL por kg de semilla) de un inoculante líquido a base de *Bradyrhizobium yuanmingense* Rc-455-02.

2. METODOLOGÍA

Material biológico empleado:

Para este experimento fue empleada la cepa *Bradyrhizobium yuanmingense* Rc-455-02 (UNAB 000086), cepa altamente efectiva en la fijación simbiótica de nitrógeno con *V. unguiculata* y seleccionada por Valdez et al. (2016). Se emplearon las variedades certificadas de vaina blanca (CAR-9) para caupí y la variedad T50 para loctao, ambas de la empresa Granos y Legumbres (Perú). La cepa en estudio fue obtenida de la Colección de Microorganismos Benéficos para la Agricultura y Pecuaria (COLMiBaP-UNAB) en crioviales con glicerol al 20% a -80°C , así como en la Colección Local de Leguminosas del Laboratorio de Investigación en Biotecnología-UNAB, a 4°C .

Reactivación de la cepa:

La cepa Rc-455-02, fue reactivada a partir de un criovial conservado a -80°C mediante estría sucesiva en una placa conteniendo agar Extracto de Levadura manitol (YEM) e incubada a 28°C hasta la aparición de colonias separadas y homogéneas. Las colonias fueron homogéneamente perladas de aspecto brillante y consistencia correosa a los 7 días de incubación.

Preparación de inóculo:

Dos a tres colonias del cultivo puro reactivado fueron sembradas en 20 mL de caldo Extracto de Levadura Manitol (YEM) estéril (g L^{-1}), Manitol, 5.0; K_2HPO_4 , 0.5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.2; NaCl, 0.1; Extracto de levadura, 0.4. pH 6.8 \pm 0.2. contenido en un matraz de 50 mL, e incubados a 150 rpm por 5 días hasta obtener una $\text{D.O}_{600\text{ nm}}$ aproximada de 1.0. La población celular viable del inóculo en estudio fue determinada mediante la técnica de recuento en placa empleando el método en superficie inoculadas con las cuatro últimas diluciones decimales realizadas al inóculo en estudio (10^{-5} - 10^{-9}).

Determinación del número de rizobios viables por semilla bajo diferentes concentraciones:

Se determinó el número de rizobios viables presentes en la superficie de una semilla siguiendo la metodología sugerida por Ferreira et al. (2024). Las semillas de caupí y de loctao fueron inoculadas con 6 concentraciones crecientes de inoculante formulado con *B. yuanmingense* Rc-455-02 (25, 30, 35, 40, 45 y 50 mL por kg de semilla). Se realizaron unidades experimentales conteniendo 10 gramos de semilla. Cada concentración presentó cuatro grupos de semillas (repeticiones) conteniendo 5 semillas por tratamiento. Finalizada la inoculación de las semillas con las respectivas concentraciones, las semillas fueron vertidas y oreadas en una placa de Petri estéril. Para el proceso de recuento celular, las 5 semillas fueron trasladadas a un tubo tapa rosca (25 x 130 mm) conteniendo 5 mL de solución salina fisiológica estéril, y luego agitados mediante vortex por 5 minutos. Se procedió a realizar las diluciones decimales a razón de 1:10 mL. Empleando el método de recuento de gota en placa, 30 μ L de la cuatro últimas diluciones, 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6} , fueron empleadas para caupí, y 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5} , para loctao., fueron sembradas en cuatro cuadrantes de placas de Petri conteniendo Agar YEM suplementado con 25 μ g de rojo de Congo mL⁻¹. Las placas fueron incubadas a 30°C por 5 días. El experimento fue realizado por triplicado.

Análisis de datos:

Los datos de recuento celular fueron expresados en base de logaritmo decimal (Log10), y se analizó la normalidad y homocedasticidad de los datos. Empleando un análisis de varianza empleando el estadístico de Tukey al 95%, se procedió a determinar las diferencias estadísticas entre concentraciones de inoculante y si existe diferencia entre semillas de ambas especies de leguminosas, también fue calculado el nivel de correlación entre las variables concentración de inoculante frente a número de rizobios viables por semilla. Se empleó el software estadístico InfoStat (Di Rienzo et al. 2010).

3. RESULTADOS

El número de células viables alcanzó valores promedio en el rango de 1.03 a 1.20 x 10⁹ (9.01-9.08) UFC por mL de inoculante líquido. La concentración de rizobios por semilla fue variable y significativo en cada una de las especies, siendo superior en semillas de caupí e inferior en semillas de loctao. Así mismo, la concentración de rizobios por semilla, aunque no fue significativa en semillas inoculadas con concentraciones bajas, si lo fue en concentraciones altas, para ambos tipos de semillas.

El número de células de *B. yuanmingense* viables sobre semillas de caupí variedad CAR-9, estuvo en el rango de 6.08 a 6.79, y fue estadísticamente superior solo en la concentración de 50 mL de inoculante por kg de semilla alcanzando una población promedio de 6.79 (6.67 x 10⁶ UFC semilla⁻¹), por otro lado, en semillas de loctao variedad T-50, el número de células de *B. yuanmingense* Rc-455-02 fue similar y estuvo en el rango de 5.49 a 5.85, sin diferencia significativa en todas las concentraciones empleadas (Tabla 01).

Tabla 01

Número de rizobios viables sobre la superficie de semillas de caupí y loctao inoculada con seis concentraciones de inoculante líquido de *B. yuanmingense* Rc-455-02

Concentración de inoculante	Caupí	Loctao
mL kg de semilla	Células semilla ⁻¹ (Log ₁₀)	
25	6.09 (± 0.04) C ^a	5.49 (± 0.03) C ^b
30	6.18 (± 0.02) C ^a	5.95 (± 0.01) A ^b
35	6.08 (± 0.02) C ^a	5.62 (± 0.03) BC ^b
40	6.31 (± 0.02) BC ^a	5.58 (± 0.06) BC ^b
45	6.46 (± 0.00) B ^a	5.56 (± 0.13) BC ^b
50	6.79 (± 0.12) A ^a	5.85 (± 0.01) AB ^b
CV (%)	1.51	1.87

4. DISCUSIÓN

Conocer el número de rizobios por semilla es un factor crucial para el desempeño simbiótico. En nuestro estudio, se observaron diferencias numéricas, de hasta un logaritmo, entre las poblaciones de rizobios presentes sobre la superficie de semillas de *Vigna unguiculata* y *Vigna radiata*. da Silva et al. (2018) reportaron 1.2 millones de rizobios viables por semillas de caupí, como valor referencial, valores similares (Log 6.2) también fueron reportados por Monisha et al. (2023) en semillas de *Vigna mungo*. Estos datos son similares a los obtenidos en el presente estudio. *Bradyrhizobium yuanmingense*, se ha reportado como el principal rizobio asociado de manera efectiva con caupí (do Nascimento et al. 2021; Leite et al. 2018; Valdez et al. 2016), y aunque son varios los factores, que podrían incrementar su interacción con las semillas, se destacan que la producción de exopolisacáridos por *Bradyrhizobium*, incrementaría su capacidad de adhesión y supervivencia sobre la superficie de la semilla, tal como lo reportó Palhares et al. (2022).

Se observó una correlación entre la concentración de inoculante empleada y el número de rizobios por semilla, siendo positiva para el caso de *Vigna unguiculata* ($r^2=0.90$), pero una correlación positiva débil para *Vigna radiata* ($r^2=0.17$). Esta diferencia podría deberse al tamaño entre semillas, para el caso de *Vigna radiata*, podemos deducir que la superficie de la semilla de caupí es mayor en superficie que la semilla de loctao, siendo cubierta en su totalidad, observándose una distribución homogénea en las concentraciones crecientes y sin diferencias estadísticas, alcanzando su máximo en la concentración de 30 mL por kg de semilla. Para las semillas de *Vigna unguiculata*, las concentraciones de 25 y 45 mL por kg de semilla, fueron estadísticamente similares, por lo que se recomendaría la concentración de 30 mL kg de semilla.

5. CONCLUSIONES

La concentración recomendada en ambas leguminosas para la aplicación de inoculante con formulación líquida, no deberá superar los 30 mL por kg de semilla, asegurando una población bacteriana viable para una adecuada infección radicular y formación de nódulos en raíz principal. Se recomienda evaluar la supervivencia de *B. yuanmingense* bajo diferentes tiempos, así como los parámetros simbióticos. Estos datos serán importantes para poder formular adecuadamente los inoculantes a ser empleados bajo condiciones de campo.

AGRADECIMIENTOS

A la Vicepresidencia de investigación por el financiamiento del proyecto titulado: “Caracterización y filogenia de rizobios aislados de nódulos de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. “caupí” cultivados en la costa peruana” R.C.O. N° 153-2024-UNAB. Al Blgo. Ángel Valladolid Chiroque, gerente de Granos y Legumbres SAC por la donación de semillas para el presente estudio.

REFERENCIAS

- Alianza Leguminosas para la salud (2021). ¿Cómo las leguminosas pueden ser aliadas en la prevención y control de enfermedades de sus pacientes? US Dry Bean Council. <https://www.alianzaleguminosas.org/assets/pdf/ManualAlianzaIndustria.pdf>
- Atkinson, R., Horna, D., Barrenechea, J., Flores, M., Ramírez, M., Sánchez, R. A., Arbizu, C. I., Maurer, A. (2023). DEL CAMPO A LA MESA: Análisis y Recomendaciones sobre el Hallazgo de Residuos Excesivos de Plaguicidas en Productos Agrícolas en el Perú. Lima: 42 páginas, CONCYTEC. Disponible en: <https://cdn.www.gob.pe/uploads/document/file/5314736/41037-del-campo-a-la-mesa-202310222-bnp.pdf>
- Deaker, R., Hartley, E., Gemell, G., Herridge, D.F., Karanja, F. (2016) Inoculant production and quality control. In: Howieson, J. G., & Dilworth, M. J. (2016). *Working with rhizobia* (p. 173). Canberra: Australian Centre for International Agricultural Research.
- Di Rienzo, J., Balzarini, M., Gonzalez, L., Casanoves, F., Tablada, M., & Walter Robledo, C. (2010). Infostat: software para análisis estadístico.
- Ferreira, E., Nogueira, M., & Hungria, M. (2024). Manual de análisis de bioinsumos para uso agrícola: inoculantes. EMBRAPA, Brasilia, DF.
- Leite, J., Passos, S. R., Simões-Araújo, J. L., Rumjanek, N. G., Xavier, G. R., & Zilli, J. É. (2018). Genomic identification and characterization of the elite strains *Bradyrhizobium yuanmingense* BR 3267 and *Bradyrhizobium pachyrhizi* BR 3262 recommended for cowpea inoculation in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 49, 703-713. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2017.01.007>
- Martins, S. J., Taerum, S. J., Triplett, L., Emerson, J. B., Zasada, I., de Toledo, B. F., & Bull, C. T. (2022). Predators of soil bacteria in plant and human health. *Phytobiomes Journal*, 6(3), 184-200. <https://doi.org/10.1094/PBIOMES-11-21-0073-RVW>
- Masson-Boivin, C., & Sachs, J. L. (2018). Symbiotic nitrogen fixation by rhizobia—the roots of a success story. *Current Opinion in Plant Biology*, 44, 7-15. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2017.12.001>
- Mogale, E. T., Ayisi, K. K., Munjonji, L., & Kifle, Y. G. (2023). Biological nitrogen fixation of cowpea in a No-till intercrop under contrasting rainfed agro-ecological environments. *Sustainability*, 15(3), 2244. <https://doi.org/10.3390/su15032244>
- Monisha, S., Renganayaki, P. R., Sundareswaran, S., Nakkeeran, S., & Varanavasiappan, S. (2023). Seed Coating with Biodegradable Stickers for Enhancement of Inoculant Viability and Their Beneficial Properties on Seed Germination of Blackgram [*Vigna mungo* (L.) Hepper.]. *Agricultural Science Digest*, 43(4), 472-477. <https://10.18805/ag.D-5724>

- do Nascimento, T. R., Sena, P. T. S., Oliveira, G. S., da Silva, T. R., Dias, M. A. M., de Freitas, A. D. S., Fernandes-Júnior, P. I. (2021). Co-inoculation of two symbiotically efficient *Bradyrhizobium* strains improves cowpea development better than a single bacterium application. *3 Biotech*, *11*, 1-12. <https://doi.org/10.1007/s13205-020-02534-5>
- O'Hara, G. W.; Hungria, M.; Woome, P.; Howieson J. G. (2016) Counting Rhizobia. In: Howieson, J. G., & Dilworth, M. J. (2016). *Working with rhizobia* (p. 173). Canberra: Australian Centre for International Agricultural Research.
- Palhares Farias, T., Lima Soares, B., Barbosa D'Eça, C. S., & de Souza Moreira, F. M. (2022). Polymeric formulations of liquid inoculants with rhizobia exopolysaccharides increase the survival and symbiotic efficiency of elite *Bradyrhizobium* strains. *Archives of Microbiology*, *204*(3), 177. <https://doi.org/10.1007/s00203-022-02779-z>
- Peix, A., Ramírez-Bahena, M. H., Velázquez, E., & Bedmar, E. J. (2015). Bacterial associations with legumes. *Critical Reviews in Plant Sciences*, *34*(1-3), 17-42. <https://doi.org/10.1080/07352689.2014.897899>
- Pratap, A., & Gupta, S. (Eds.). (2020). *The beans and the peas: From orphan to mainstream crops*. Woodhead Publishing, India.
- PromPeru (2024) Disponible en: <https://exportemos.pe/inteligencia-para-exportar/estadisticas-de-exportaciones-peruanas/ranking-por-partidas> [Accedido el 11 de julio del 2024].
- da Silva Júnior, E. B., Favero, V. O., Xavier, G. R., Boddey, R. M., Zilli, J. E. (2018). Rhizobium inoculation of cowpea in Brazilian cerrado increases yields and nitrogen fixation. *Agronomy Journal*, *110*(2), 722-727. <https://doi.org/10.2134/agronj2017.04.0231>
- Sharma, P., Sekhon, H. S., Singh, G., Shanmugasundaram, S. (2003). Biological nitrogen fixation in mungbean: An overview. In *Final Workshop and Planning Meeting on Mungbean* (pp. 189-201).
- Santos, M. S., Nogueira, M. A., Hungria, M. (2019). Microbial inoculants: reviewing the past, discussing the present and previewing an outstanding future for the use of beneficial bacteria in agriculture. *Amb Express*, *9*(1), 205. <https://doi.org/10.1186/s13568-019-0932-0>
- Singh, V., Kumar, B. (2024). A review of agricultural microbial inoculants and their carriers in bioformulation. *Rhizosphere*, 100843. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2023.100843>
- Stagnari, F., Maggio, A., Galieni, A., & Pisante, M. (2017). Multiple benefits of legumes for agriculture sustainability: an overview. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, *4*, 1-13. <https://doi.org/10.1186/s40538-016-0085-1>
- Valdez, R. A., Soriano, B., Prado, G., Zavaleta, D., Matsubara, M., Zúñiga, D., Bedmar, E. J. (2016). Symbiotic and Agronomic Characterization of Bradyrhizobial strains nodulating cowpea in Northern Perú. In *Biological nitrogen fixation and beneficial plant-microbe interaction* (pp. 195-212). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-32528-6_17
- Valdez-Nuñez, R. A.; Silvera-Pablo, C. C.; Bedmar, E. J. (2022). Las leguminosas y su microbioma en la agricultura sostenible. 1^{era} edición. Editorial Universidad Nacional de Barranca. Perú.

- Verma, V. C., Acharya, S., Kumar, R., Verma, B. C., Singh, A., Tiwari, V. K. (2022). Rhizobium as soil health engineer. In *Rhizosphere Engineering* (pp. 77-95). Academic Press.
- Yan, Z., Zhou, J., Liu, C., Jia, R., Mganga, K. Z., Yang, L., Zeng, Z. (2023). Legume-based crop diversification reinforces soil health and carbon storage driven by microbial biomass and aggregates. *Soil and Tillage Research*, 234, 105848. <https://doi.org/10.1016/j.still.2023.105848>